

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication .  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 674 253**

②① N° d'enregistrement national :

**91 03342**

⑤① Int Cl<sup>5</sup> : C 12 Q 1/68

①②

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②② Date de dépôt : 19.03.91.

③⑦ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 25.09.92 Bulletin 92/39.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : Société dite: *DIAGNOSTICS  
PASTEUR — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *Brisson-Noël Anne et Laure Françoise.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : *Cabinet Lavoix.*

⑤④ Composition lyophilisée pour la multiplication de séquences d'acides nucléiques.

⑤⑦ L'invention a pour objet une composition comprenant  
les réactifs nécessaires à une amplification d'acides nucléi-  
ques, notamment par la méthode PCR, caractérisée en ce  
qu'elle se présente sous forme lyophilisée.

**FR 2 674 253 - A1**



La présente invention concerne une composition pour mettre en oeuvre une méthode d'amplification d'un acide nucléique dont on recherche la présence dans un échantillon d'origine biologique.

5 Diverses méthodes d'amplification d'acides nucléiques ont été décrites récemment que ce soit la méthode dite PCR (polymerase chain reaction), pour laquelle on peut se référer à EP-A-0 200 362, la méthode utilisant une transcription de l'ADN recherché  
10 en ARN, pour laquelle on peut se référer à EP-A-0 373 960 ou celle utilisant une réaction de ligation, décrite dans WO 90/01069.

La méthode PCR consiste à réaliser une néosynthèse d'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques, chaque amorce étant complémentaire de  
15 l'un des deux brins de la molécule d'ADN que l'on veut mettre en évidence.

La synthèse est effectuée à partir des amorces hybridées sur leurs brins respectifs à l'aide  
20 d'une enzyme, une ADN polymérase qui enchaîne les quatre désoxyribonucléotides dATP, dGTP, dCTP et dTTP introduits dans l'échantillon à étudier.

Les molécules d'ADN double brin, obtenues à l'issue d'une première étape de synthèse, à partir des  
25 deux brins d'ADN présents dans l'échantillon, sont dénaturées par chauffage, et une nouvelle étape de synthèse est effectuée après hybridation des amorces sur les brins séparés. La répétition des étapes de dénaturation, hybridation et synthèse permet d'obtenir  
30 jusqu'à  $10^6$  à  $10^8$  copies du fragment compris entre les 2 amorces de l'ADN recherché après 30 à 40 cycles, c'est-à-dire en quelques heures, avec un nombre de manipulations limitées. Cette méthode est particulièrement performante lorsque l'ADN polymérase est stable

dans les conditions de dénaturation, puisque l'on peut alors introduire dans le milieu d'essai la totalité des réactifs nécessaires dès le début du procédé.

L'amplification est généralement réalisée dans un volume de 50 à 100  $\mu$ l, en milieu aqueux. Le milieu contenant les 2 amorces nucléotidiques, les 4 désoxyribonucléotides, l'ADN polymérase, l'ADN à amplifier dans l'échantillon à étudier, ainsi que le tampon nécessaire à la réaction enzymatique est, de préférence, recouvert de 100  $\mu$ l environ d'huile minérale pour éviter toute évaporation.

Pour réaliser une amplification, l'opérateur devait jusqu'à présent effectuer de nombreuses manipulations. En effet, le protocole préconisé par les inventeurs de la technique, décrit dans PCR Protocols: "a guide to methods and applications" - Innis et col. (1990) implique la préparation extemporanée d'un mélange concentré des différents réactifs à partir de solutions mères de forte concentration de chacun d'eux, conservées à -20°C, étant donné l'instabilité de ces réactifs en solution aqueuse diluée. Le mélange concentré est ensuite réparti dans les tubes, ou récipients analogues, où aura lieu l'amplification; de l'eau est introduite dans chacun des tubes en quantité suffisante pour obtenir un volume final de 50 à 100  $\mu$ l, et enfin les échantillons contenant l'ADN à tester et l'huile. Ces nombreux pipetages sont fastidieux mais aussi source d'erreurs et surtout multiplient les risques de contamination, phénomène fréquemment signalé par les utilisateurs de la PCR, comme par exemple dans J. Infect. Dis. 158 1154-1157 (1988) ou J. Virol. Meth. 25 179-188 (1989).

Cette technique est actuellement en plein développement; elle permet de déceler des infections

virales graves, dès leur origine, alors que les particules virales sont encore en faible concentration dans les milieux biologiques et son application à la détection du SIDA, de la tuberculose, de la toxoplas-  
5 mose, des hépatites, ne peut que se généraliser; son application, par exemple, à la détermination de marqueurs génétiques est aussi pratiquée. Mais un large emploi en routine dans les laboratoires d'analyses biologiques n'est concevable que si elle est  
10 sûre et si son coût n'est pas prohibitif, notamment en terme de main d'oeuvre.

La présente invention améliore les conditions d'utilisation pratique de la méthode PCR. Elle pourrait être utilisée pour les autres méthodes d'am-  
15 plification, moins répandues actuellement.

L'invention consiste en une composition pour l'amplification d'acides nucléiques contenant les réactifs nécessaires à la réaction d'amplification, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme  
20 lyophilisée.

Plus particulièrement pour la mise en oeuvre de la méthode PCR, la composition lyophilisée selon l'invention comprend les 2 amorces oligonucléotidiques caractéristiques de l'ADN à amplifier, les 4 désoxy-  
25 ribonucléotides : dATP, dGTP, dCTP et dTTP, les constituants du tampon convenant à la réaction enzymatique et éventuellement l'ADN polymérase, en proportions relatives convenables.

Cette composition est stable à 4°C, contrairement aux solutions mères des réactifs actuellement  
30 utilisées; c'est un avantage non négligeable de la composition selon l'invention, puisqu'elle permet le transport des réactifs du lieu de leur fabrication vers les utilisateurs et leur conservation en milieu

réfrigéré, vers 5°C environ au lieu de -20°C antérieurement, pour des résultats d'amplification identiques.

5 La composition selon l'invention peut être présentée dans des flacons ou des tubes en verre ou en plastique, fermés hermétiquement, de volume adapté au poids de la composition et qui permettent, de préférence, la lyophilisation in situ à partir d'une solution des réactifs, préparée par mélange des réactifs  
10 éventuellement en solutions, obtenus à l'issue de leur fabrication.

La quantité de composition présente dans chaque récipient peut être très variable, suffisante pour 1 à 100 réactions d'amplification, suivant les  
15 besoins de l'utilisateur; en général on préfère introduire la quantité nécessaire pour 5 à 50 réactions d'amplification environ, et le volume du récipient sera de 0,1 ml à 0,5 ml par réaction.

La composition conditionnée est conservée à  
20 une température inférieure à 5°C, notamment entre 0 et 5°C.

La composition peut aussi être présentée en doses unitaires réparties dans les puits d'une plaque de microtitration, dans un emballage étanche.

25 La quantité de composition nécessaire pour une amplification dépend du type d'échantillon et de la nature de l'ADN à rechercher. On sait, qu'en général, pour un volume d'échantillon de 10 µl, on utilise entre 10 nmoles et 20 nmoles de chacun des désoxyribonucléotides, entre 1 unité et 5 unités d'ADN polymérase et entre 10 et 40 pmoles de chaque amorce; les  
30 réactions d'amplification sont effectuées en milieu aqueux tamponné à raison de 5 à 10 µl de milieu par µl d'échantillon.

Lorsque l'amplification est effectuée à l'aide de l'ADN polymérase Taq, commercialisée par Perkin Elmer Cetus (Emeryville-Ca-USA), on préfère ne pas introduire l'enzyme dans la composition selon l'invention et utiliser le tampon 10X, connu pour être particulièrement bien adapté, qui est composé d'une solution aqueuse de 500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, ajustée à pH 8,3 et 2,15 mM de  $MgCl_2$  ainsi que 0,1 % (p/V) de gélatine.

Avec la composition selon l'invention, l'utilisateur n'aura plus qu'à effectuer un nombre d'opérations limitées pour la préparation de l'amplification, à savoir :

- 1 addition dans le récipient où se trouve la composition du volume d'eau convenable,
- 2 éventuellement introduction dans le récipient de l'ADN polymérase lorsqu'elle n'est pas dans la composition,
- 3 répartition du volume de solution nécessaire dans les différents tubes d'amplification,
- 4 introduction dans les tubes des échantillons à étudier ou des témoins,
- 5 introduction dans les tubes de l'huile.

On a ainsi constaté que pour préparer 20 tubes d'amplification à partir de la composition selon l'invention, il fallait 10 minutes, alors qu'en opérant avec les réactifs congelés classiques, étant donné le temps de décongélation (4 minutes) et le nombre de pipetages, il fallait pour le même opérateur 20 minutes.

Lorsque la composition est conditionnée dans des plaques de microtitration, la troisième étape n'est pas effectuée.

Dans ce qui suit, on décrit des exemples de préparation de la composition et de sa mise en oeuvre pour la détection du virus VIH1 et de mycobactéries du groupe de la tuberculose.

5

#### EXEMPLE 1

Préparation d'une composition sans enzyme conditionnée pour 10 réactions d'amplification par PCR :

10 On répartit à température ambiante dans 10 flacons de 3 ml, 500 µl par flacon d'une solution contenant, pour 5 ml :

2 nmoles d'oligonucléotide A (amorce N° 1),  
2 nmoles d'oligonucléotide B (amorce N° 2),  
15 1,25 nmoles de chaque désoxyribonucléotide  
(DATP, dGTP, dCTP, et dTTP),  
1 ml de tampon 10X;

et on effectue une lyophilisation dans un lyophilisateur type Usifroid 231 H :

20 les flacons sont congelés à -50°C puis l'enceinte est mise sous vide (1000 Pa); après 24 heures à -50°C, ils sont maintenus pendant 5 heures à 0°C puis pendant 5 heures à 30°C. A cette température, l'enceinte est ramenée à pression ordinaire et les flacons fermés  
25 hermétiquement.

#### EXEMPLE 2

Préparation d'une composition sans enzyme, conditionnée pour 20 réactions d'amplification par PCR.

30

On effectue les mêmes opérations qu'à l'exemple 1 à partir d'une solution contenant :

33 µl d'une solution à 1 mg/ml d'amorce N° 1,  
33 µl d'une solution à 1 mg/ml d'amorce N° 2,  
125 µl d'une solution 25 mM de chaque désoxyribonucléotide,

2,5 ml de tampon 10 X, et,

2,3 ml d'eau distillée stérile

APPLICATION N° 1 : Détection de l'ADN du virus VIH1

On a utilisé un flacon préparé selon  
5 l'exemple 1, avec des amorces spécifiques du gène pol  
du virus VIH1. Les échantillons à étudier étaient  
constitués de dilutions successives d'ADN du virus de  
la lignée cellulaire 8E5 mentionnée dans Science 231  
600-602 (1986), contenant 1000, 500, 100, 10 et 1  
10 copie par  $\mu$ l.

On a introduit 1 ml d'eau stérile et 4  $\mu$ l  
d'une solution d'ADN polymérase Taq dans un flacon, et  
100  $\mu$ l de la solution obtenue ont été introduits dans  
5 tubes de 0,5 ml. Après addition de 1  $\mu$ l de chaque  
15 dilution à étudier et de 2 gouttes (environ 100  $\mu$ l)  
d'huile minérale, les tubes ont été placés dans une  
machine à amplifier, commercialisée par Perkin Elmer  
Cetus sous la dénomination "DNA thermal cyclor", pour  
réaliser 40 amplifications, à raison pour chacune d'1  
20 minute à 94°C, 1 minute à 60°C, puis 1 minute à 72°C.

On a par ailleurs effectué, à titre compa-  
ratif, la même série d'amplifications sur des milieux  
préparés, à partir de solutions congelées de chacun  
des réactifs, comme suit :

25 on prépare une solution mère contenant

100  $\mu$ l de tampon 10 X,

10  $\mu$ l d'une solution 20  $\mu$ M de l'amorce N° 1,

10  $\mu$ l d'une solution 20  $\mu$ M de l'amorce N° 2,

5  $\mu$ l d'une solution 25 mM des 4 désoxyri-

30 bonucléotides, et,

5  $\mu$ l d'enzyme Taq Polymérase à 5 unités/ $\mu$ l

On distribue 77  $\mu$ l d'eau distillée stérile  
dans 5 tubes de 0,5 ml et on ajoute dans chaque tube  
13  $\mu$ l de solution mère puis 10  $\mu$ l d'échantillon et  
deux gouttes d'huile par tube.



Après amplification, les échantillons ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose et les fragments amplifiés visualisés par coloration au bromure d'éthidium.

5 La détection d'une seule copie d'ADN viral a été réalisée dans les 2 cas, que l'on ait utilisé la composition lyophilisée de l'invention ou les réactifs congelés.

10 APPLICATION N° 2 : Détection de la séquence IS6110 de Mycobacterium tuberculosis

On a utilisé un flacon préparé selon l'exemple 1 avec les amorces ISTB2 et ISTB7, qui permettent l'amplification de 325 paires de bases, décrites dans J. Clin. Microbiol. 28 p. 2668-2670 (1990).

15 les échantillons à étudier étaient constitués de dilutions successives au 10ème à partir de 1 ng jusqu'à 1 fg d'ADN purifié de M. Tuberculosis. On a effectué deux séries d'amplification avec une composition de l'invention et à titre comparatif, avec les réactifs congelés. Suivant le protocole décrit dans l'exemple précédent, après amplification, les échantillons ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose, transférés sur membrane de nylon et hybridés avec une sonde spécifique marquée au <sup>32</sup>P (technique de Southern).

20 Dans les 2 séries on a pu détecter ainsi 10 fg d'ADN, ce qui correspond à 3 mycobactéries présentes dans l'échantillon.

30 On obtient les mêmes résultats avec la composition selon l'invention après conservation pendant 3 mois, 6 mois et 9 mois à 4°C.

REVENDEICATIONS

1. Composition comprenant les réactifs nécessaires à une amplification d'acides nucléiques, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme lyophilisée.  
5
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est conservée à une température comprise entre 0 et 5°C.
3. Composition selon la revendication 1 ou 2, pour la mise en oeuvre de la méthode PCR, caractérisée en ce qu'elle contient 2 amorces nucléotidiques, les désoxyribonucléotides : dATP, dGTP, DCTP et dTTP et les constituants du tampon convenant à la réaction enzymatique.  
10
4. Composition selon la revendication 3, comprenant en outre l'ADN polymérase.  
15
5. Composition selon l'une des revendications 3 et 4 pour la méthode PCR mettant en oeuvre l'ADN polymérase Taq, caractérisée en ce qu'elle contient les constituants du tampon composé d'une solution de 500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl (pH 8,3) et 15 mM de  $MgCl_2$  ainsi que 0,1% (p/V) de gélatine.  
20
6. Composition selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est présentée dans un récipient hermétique en quantité suffisante pour 1 à 100 amplifications.  
25
7. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est répartie dans une plaque de microtitration sous emballage hermétique.

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9103342  
FA 454546

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	JAPANESE PATENTS ABSTRACTS Section Ch, Week 9114, 22 Mai 1991 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B, Page 11, AN 91-098572 & JP-A-03 043 100 (TAKARA SHUZO KK) 25 Février 1991	1
Y	* abrégé * ---	2-7
Y	EP-A-0 298 669 (AMERSHAM INTERNATIONAL) * le document en entier * ---	2-7
A	EP-A-0 381 501 (EASTMAN KODAK CO.) * abrégé * * colonne 12, ligne 24 - ligne 27 * ---	1
A	R.WU EDITOR 'Methods in enzymology-Vol.155' 1987, ACADEMIC PRESS K.B.MULLIS "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction" p.335-350 * le document en entier * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12Q
Date d'achèvement de la recherche 07 NOVEMBRE 1991		Examineur LUZZATTO E. R.
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)

**This Page Blank (uspto)**